

乳酸菌・酵母を利用した新規穀類加工食品の開発

井上和春*¹ 大澤千恵子*¹ 高橋広子*² 石川準一**¹ 吉岡久雄**² 又重英一***

Development of New Cereal Processed Food
Using Lactic acid bacterium and Yeast

INOUE Kazuharu*¹, OSAWA Chieko*¹, TAKAHASHI Hiroko*²
ISHIKAWA Junichi**¹, YOSHIOKA Hisao**², MATASHIGE Eiichi***

抄録

自然発酵パン種(サワードウ)中の乳酸菌は *Lactobacillus sanfrancisco*、酵母は *Saccaromyces cerevisiae* であった。また、自然発酵パン種は *Bacillus subtilis* の芽胞及び *Escherichia coli* に対し抗菌性、*Aspergillus oryzae* 胞子に対しては静菌作用を示した。

発酵糠を用いて保存性、簡便性に優れた漬床を製造した。この漬床で製造した漬物は風味、食感が良好であった。

キーワード：自然発酵パン種，乳酸菌，酵母，抗菌性，発酵穀粉

1. はじめに

前報¹⁾で、自然発酵パン種(サワードウ)を利用することによる「発酵米粉の製造法」並びにそれをういた米菓、洋菓子等の製造例を示した。本報では自然発酵パン種中の乳酸菌と酵母を分子生物学的手法並びに生理化学的手法を用いて同定すると共に自然発酵パン種の抗菌性試験を行った。また、「発酵糠床」、「洋菓子」等の新製品開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 乳酸菌・酵母の同定

2.1.1 分子生物学的手法

自然発酵パン種から乳酸菌・酵母を11コロニー

ずつ分離した。それぞれのDNAをTAKARA Dr.Gen TLE™ for Yeastを用いて抽出し、乳酸菌は16SrRNA(約1500塩基)、酵母は26SrRNA(約600塩基(D1D2領域を含む))をPCR(Polymerase Chain Reaction)法で増幅させた。その増幅した部位の配列をシーケンサーで遺伝子解析し²⁾、データベース(BLAST)で相同性検索を行った。乳酸菌のみ、増幅した部位をpCR2.1 Vectorに組み込み、大腸菌(K12)で形質転換したものをシーケンサーで遺伝子解析した。

2.1.2 生理化学的手法

分離した乳酸菌をBD BBLCRYSTAL GP同定検査薬、MRS液体培地培養によるガス発生の有無³⁾(ダーラム管使用)により調べた。

2.2 微生物数の測定方法

乳酸菌数、酵母数：前報¹⁾と同様の方法で行った。
大腸菌数：前報¹⁾大腸菌群数の測定方法と同様の方法で行った。

バチルス芽胞菌数：試料を沸騰水浴中で10分間熱

*¹ 北部研究所 生物工学部

*² 北部研究所 技術支援交流室

**¹ みたけ食品工業(株)

**² (株)愛工舎製作所

*** 東洋大学

処理、標準寒天培地で35 48時間培養後のコロニ
ー数を算定した。

カビ数：シクロヘキシミド10ppm 加ポテトデキ
ストロ-ス寒天平板培地に0.2ml コンラージ棒で
塗抹、28 3~5日培養後算定した。

2.3 自然発酵パン種の発酵経過

自然発酵パン種製造機(株愛工舎製作所：製品
名 ルパン30)を使用して「自然発酵パン種」の
27 における発酵経過を調べた。

表1 自然発酵パン種の配合割合

自然発酵パン種	1000 g
小麦粉	2000 g
水(35)	2800 g
モルト	4 g

2.4 自然発酵パン種の抗菌性試験

2.4.1 供試菌株及び試験方法

(1) パチルス芽胞菌：*B. subtilis* JCM 1465 を普
通ブイヨン培地で35 96時間培養した。これを80
00rpm/10min 遠沈後上澄みを捨て、水に懸濁して
パン種更新時に添加し、初発とした。

(2) 大腸菌：*E. coli* JCM 1649 を普通ブイヨン
培地で35 48時間培養した。これを8000rpm/10min
遠沈後上澄みを捨て、水に懸濁してパン種更新時
に添加し、初発とした。

(3) カビ：吟醸用麹カビ(日本醸造工業(株)製)
をツーン80加滅菌水に溶解し、パン種更新時に
添加した。これを初発とした。

2.5 発酵米粉の保存試験及び乾燥試験

前報¹⁾同様の方法で米粉(みたけ食品工業(株)製
：上用粉)を発酵処理(3回更新)した発酵米粉
について保存試験並びに乾燥試験を実施した。保
存試験は発酵米粉にソボロ状になるまで米粉(上
用粉)を加えたものを-30、5、25 に保存
し、酵母数及び乳酸菌数の変化を調べた。また、
乾燥試験は発酵米粉にソボロ状になるまで米粉
(上用粉)を加え、ミートチョッパー(株)大道産
業：製品名 ベリタス)で整形したものを水分11
%台を目標に温風乾燥及びマイクロ波通風乾燥(M
W)を行った。また、凍結乾燥も行い、酵母数及
び乳酸菌数を測定、比較検討した。

2.6 糠床の抗菌性試験及び漬込み試験

2.6.1 抗菌性試験材料

(1) 糠床の種類

市販糠床

発酵糠凍結乾燥(+水+塩+調味料)

発酵糠+煎り糠(+塩+調味料)

発酵糠凍結乾燥50%+煎り糠50%(+水+塩+
調味料)

を1週間前に調整したもの

以上を全て同程度の硬さに調整し、供試糠床とし
た。

(2) 供試菌株

表2の菌株懸濁液をシャーレに詰めた糠床の中
心に0.1ml添加した。7 及び28 に保存し、糠床
表面の添加菌の生育状況を肉眼で観察した。

表2 供試菌株及び懸濁液の菌数/ml

イ	麹カビ(日本醸造工業(株)製:吟醸用)	2.6×10^6
ロ	<i>Phia anomara</i> JCM 5209	7.5×10^7
ハ	糠床分離酵母-1	8.5×10^7
ニ	糠床分離カビ-1	2.8×10^7
ホ	<i>B. subtilis</i> JCM 1465	1.4×10^8
ヘ	糠床分離酵母-2	5.5×10^7
ト	糠床分離カビ-2	1.4×10^7
チ	糠床分離カビ-3	1.9×10^7
リ	コントロール(菌株添加なし)	

2.6.2 漬込み試験方法

各糠床に半分に切断したカブを3片漬け込み18
時間後官能試験に供した。また、クロラムフェニ
コール加ポテトデキストロース寒天培地で糠床の
カビ数を測定した。

表3 供試糠床

	採取量g	加水量 ml	加塩量g
生糠	526	384(73%)	72(12%)
発酵糠	398	322(81%)	54(#)
発酵米粉	474	384(81%)	65(#)
煎り糠	405	304(75%)	55(#)

2.6.3 洋菓子の試作

発酵穀粉を用いて洋菓子を試作し、官能試験を
行った。

3. 結果及び考察

3.1 乳酸菌・酵母の同定結果

相同性検索の結果、分離した11種とも、乳酸菌は *Lactobacillus sanfrancisco* (相同性 96 ~ 99 %)、酵母は *Saccharomyces cerevisiae* (相同性 99 ~ 100 %) であった。また、同定検査薬によりアラビノース・エスクリン・フルクトース・ラクトース・マンニトール・トレハロースに陰性、グルコースからのガス発生が陽性であることから、乳酸菌は *Lactobacillus sanfrancisco* であることが分かった。

3.2 自然発酵パン種の発酵経過

27 8時間発酵後10 で72時間時々攪拌しながら放置した。乳酸菌数は6時間で増加のピークを迎えたが、酵母数は10 に冷却後も徐々に増加した。また、pH は初発4.7が8時間後、3.7まで低下した。

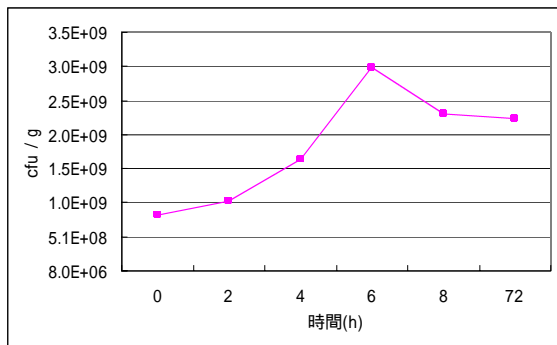


図1 乳酸菌数の経時変化

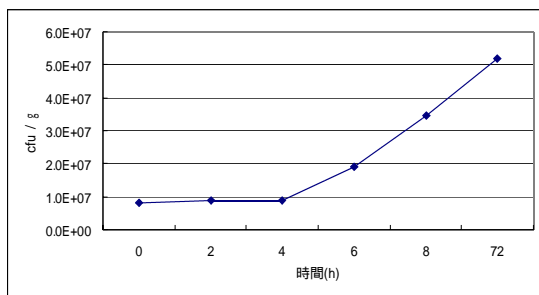


図2 酵母数の経時変化

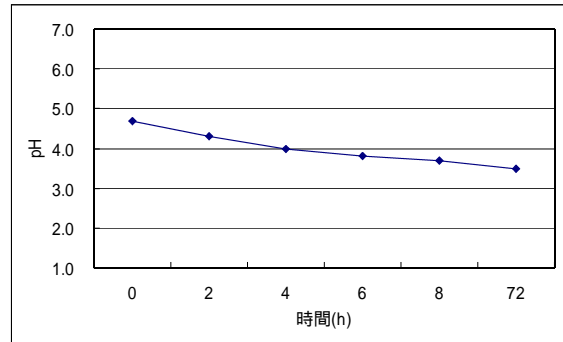


図3 pHの経時変化

3.3 自然発酵パン種の抗菌性

自然発酵パン種中のパチルス芽胞菌数は初発 9.0×10^2 /gのものが、1日目 6.5×10^1 /gに減少し、2日目には検出されなかった。大腸菌数は初発 2.3×10^6 /g から1日目 6.0×10^1 /g、2日目には検出されなかった。また、カビ数は初発 7.0×10^4 /g から6日目 6.0×10^4 /g とほぼ横這いであった。これらのことから、自然発酵パン種には抗菌性があることが確認できた。また、このことを利用した食品開発の可能性が示された。

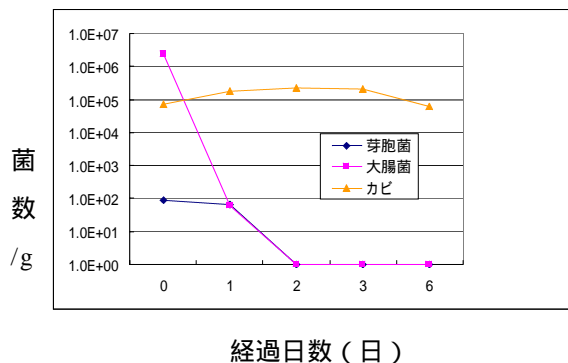


図4 自然発酵パン種の抗菌性

3.4 発酵米粉の保存試験及び乾燥試験

図5に発酵米粉の保存試験、表4に乾燥試験結果を示す。5 7日間保存したものは酵母数及び pH にほとんど変化がみられなかった。したがって乾燥試験においては5 に保存したものを随時使用することにした。乾燥後の生残菌数の多いものは MW150W20 区(マイクロ波乾燥)の乳酸菌数が 4.6×10^8 /g で一番多く、酵母数は冷蔵庫中で乾燥したものが 3.6×10^3 /g で一番多かった。しかしながら、経済性を考慮すると、温風30 乾燥が良いと思われた。

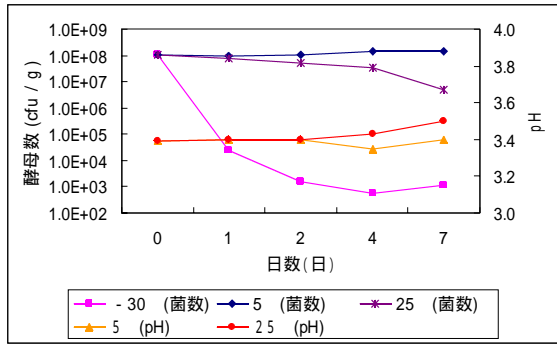


図5 発酵米粉の保存試験

表4 乾燥発酵米粉の乳酸菌数・酵母数

乾燥方法	乳酸菌数/g	酵母数/g	乾燥時間
1 温風 30	3.7×10^7	2.2×10^3	210分
2 " 40	3.6×10^7	2.0×10^2	135分
3 MW250W 15	4.4×10^7	3.6×10^2	260分
4 " 20	1.3×10^6	1.3×10^2	220分
5 MW150W 20	4.6×10^8	2.3×10^2	260分
6 冷蔵庫 ¹ 5	4.6×10^7	3.6×10^3	—
7 凍結乾燥 ²	2.0×10^7	2.0×10^1	—

¹冷蔵庫中、5 6日間冷風乾燥

²試料100g を-32 で6時間凍結後、最初、棚温度16 1時間その後20 に設定し、22時間乾燥した。

3.5 糠床の抗菌性試験

供試菌株(表2、イ~チ)を添加し、7 に30日間保存した。この時の糠床表面を肉眼観察した状況を表5に示す。の「市販糠床」ではほとんどの添加菌の発育が観察された。また、の「発酵糠凍結乾燥50% + 煎り糠50%」は糠床分離カビ(チ)の添加菌の発育が観察された。しかしながら、他の発酵糠を用いた糠床では添加菌の発育は観察されなかった。このことから、発酵糠を利用した糠床の抗菌性が示された。

表5 添加菌(表2、イ~チ)の生育状況

	イ	ロ	ハ	ニ	ホ	ヘ	ト	チ	リ
	+	+	+	+	-	+	+	+	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = 接種菌発育、(-) = 接種菌発育なし



図6 糠床分離カビ(チ)の発育状況(7、30日)

「市販糠床」及び「発酵糠凍結乾燥50% + 煎り糠50%」は分離カビ(チ)の発育が認められた。

3.6 漬込み試験結果

官能試験結果を表6に示す。最も美味しいと答えた人の人数とその百分率を示した。生糠で漬けたカブは少し物足りないという意見があった。発酵糠で漬けたカブは1日目から糠の風味があり、日が経つにつれて味がまろやかになり、美味しいという意見が多かった。また、発酵米粉で漬けたカブの香りとは一番良いという結果となった。糠の風味は、発酵糠で漬けたカブが一番良かった。最も美味しくカブが漬かった糠床は、酸味や、うま味を多く出す発酵糠であるという結果となった。肉眼ではカビは観察されなかったが培養すると生糠と煎り糠ではカビ数が増えていた。

表6 カブの官能試験結果(最も美味しいと答えた人数)

	1日目	2日目	3日目	7日目	10日目	14日目
生糠	5(45.5)	4(36.3)	1(10.0)	1(9.0)	1(10.0)	3(25.0)
発酵糠	5(45.5)	4(36.3)	3(30.0)	8(72.7)	7(70.0)	8(66.6)
発酵米粉	1(9.0)	1(9.0)	2(20.0)	2(18.1)	1(10.0)	1(8.3)
煎り糠	—	2(18.1)	4(40.0)	0(0.0)	1(10.0)	0(0.0)

数値単位:(人) カッコ内数値単位:(%)

発酵糠や発酵米粉を用いた漬床ではカビが増えなかった。このことから、発酵糠及び発酵米粉を使用した漬床は雑菌の増殖を抑える効果があることが分かった。糠床の官能試験で、生糠や煎り糠が一番美味しいという人が減ってきたのは、この二つの糠床にカビが増え始め、それにより味が損なわれたためとも考えられる。

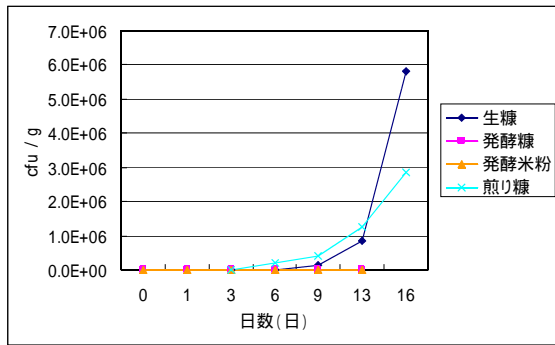


図7 漬床中のカビ数の増加

3.7 発酵穀粉による洋菓子の製造

発酵穀粉(ルバン種)10%入りパウンドケーキを製造し官能審査を行った。焼き色が少し付きにくいがかしとりと焼ける。きめ細かく出来上がる等の特徴があった。今後保存試験、物性試験等を実施し、発酵穀粉を使用した時の特徴を更に多く把握し、新製品開発に結びつけたい。

表7 パウンドケーキの配合割合と製造条件

1、全卵	1000g
2、グラニュー糖	1400g
3、食塩	8g
4、生クリーム	600g
5、薄力粉	1100g
6、BP	20g
7、F、バター	400g (溶かし)
8、ラム酒	200g
9、レモンペースト	50g (うめはら)
10、ルバン種	480g (全量の1割使用)

MT-30ホイッパーを使用し、ミキシング後約3時間寝せた。

パウンド型、生地量400g、

* 焼減率(平均6.37%)

焼成 上火190 (38分後220 設定変更)
焼成時間50分 下火160



図8 パウンドケーキ

4.まとめ

自然発酵パン種(サワードウ)中の乳酸菌は *Lactobacillus sanfrancisco*、酵母は *Saccaromyces cerevisiae* であった。また、自然発酵パン種は *Bacillus subtilis* の芽胞及び *Escherichia coli* に対し抗菌性、*Aspergillus oryzae* 胞子に対しては静菌作用を示した。

発酵糠床も抗菌性を示し、漬け込んだカブは風味が良好であった。

謝辞

本研究において客員研究員として御指導いただいた東京農業大学の小泉幸道教授、並びに微生物同定実験を遂行するにあたり御指導・御助言を賜りました東洋大学の宇佐美論助教授に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 井上和春, 石川準一, 吉岡久雄: 微生物機能を利用した米の新規用途開発, 埼玉県産業技術総合センター - 研究報告, 1, (2003)103
- 篠田吉史: 島津評論 Vol.57 No1.2(2000.8) 「16SrRNA遺伝子解析による細菌の系統分類」
- 小崎道雄: 乳酸菌実験マニュアル(朝倉書店)